

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年8月8日 (08.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/060457 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/765, A61P 43/00,
I/04, 35/00; A23L 1/30 // C08G 63/06

厚木市 森の里 2-20-1-2 Kanagawa (JP); 岡部 進
(OKABE, Susumu) [JP/JP]; 〒602-0897 京都府 京都市
上京区新御霊口町2-8-7 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/00411

(22) 国際出願日: 2002年1月22日 (22.01.2002)

(74) 代理人: 今村 正純, 外 (IMAMURA, Masazumi et al.);
〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目8番7号京橋
日産ビル8階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-16145 2001年1月24日 (24.01.2001) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 天藤
製薬株式会社 (AMATO PHARMACEUTICAL PROD-
UCTS, LTD.) [JP/JP]; 〒620-0932 京都府福知山市笹尾
町9-9-5 Kyoto (JP). 東海教育産業株式会社 (TOKAI
EDUCATION INSTRUMENTS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒
259-1143 神奈川県伊勢原市下粕屋1-6-4 Kanagawa
(JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 村上 正裕
(MURAKAMI, Masahiro) [JP/JP]; 〒547-0026 大阪府
大阪市平野区喜連西3-17-6 Osaka (JP). 高田
繁生 (TAKADA, Shigeo) [JP/JP]; 〒259-1112 神奈川
県伊勢原市東富岡517-2 Kanagawa (JP). 長戸 康和
(NAGATO, Yasukazu) [JP/JP]; 〒243-0122 神奈川県

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTI-STRESS AGENTS

(54) 発明の名称: 抗ストレス剤

(57) Abstract: It is intended to provide novel anti-stress agents usable in controlling stress. Namely, anti-stress agents containing cyclic and/or chain polylactic acid mixtures having a degree of condensation of 3 to 20.

(57) 要約:

本発明の目的は、ストレス抑制のために使用することができる新規な抗スト
レス剤を提供することである。本発明によれば、縮合度3~20の環状及び/又は
鎖状のポリ乳酸混合物を含む抗ストレス剤が提供される。

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/060457 A1

明細書

抗ストレス剤

技術分野

本発明は、抗ストレス剤に関する。より詳細には、本発明は、ストレスによって生じる精神的及び身体的疾患を予防または軽減するのに有効な医薬品、特定保健用食品、健康食品等として用いることができる抗ストレス剤に関する。

背景技術

現代社会は、科学技術が高度化・複雑化し、社会情勢も激動する環境下になっており、人々は様々なタイプの物理・化学的、心理的、社会的ストレスに曝されている。特に、国際化された社会においては、複雑な人間関係が形成されており、精神的ストレスが起因となって引き起こされる様々な症状について報告がなされている。

精神的ストレスは、循環系、免疫系等に大きな影響を及ぼすことが知られている。ストレスの科学的概念及び定義は未だ不明確な点もあり、ストレスの評価に関しては多くの問題が残されているが、近年、医学的見地からの検討がなされている。

例えば、ストレスを受けるとアンジオテンシン I I 等が増加し、ナトリウム再吸収による体内ナトリウムが過剰となり、血圧の上昇を引き起こすことが報告されている（茂原治ら：代謝，28，2，323，1991）。さらに、このような知見をもとに、高血圧治療薬として使用されているアンジオテンシン変換酵素阻害剤であるエナラプリル及びアラセプリルのストレスによる高血圧に対する効果が研究されている（The American Journal of Cardiology; 68, 15, 1362 (1991), Internal Medicine; 32, 9, 691 (1993)）。

また、心理的ストレスが脳で感知されると、広範な脳部位でノルアドレナリンの放出が亢進し、それが引金となって不安や緊張といった精神症状を引き起こ

すことが報告されている(田中正敏:代謝、Vol. 26, p122-131, 1989.)。これらのメカニズムとして、視床下部から副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)が放出され、それに呼応して下垂体から副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の分泌が増加し、ACTHは副腎皮質のコルチコイドを分泌することにより、生体防御機構が働くことが報告されている(Brandenberger, G. et al: Biol. Physiol. Vol. 10, p239-252, 1980)。

一方、視床下部は自律神経の中枢でもあるから、交感神経が刺激されてノルアドレナリンが分泌される。交感神経は副腎髄質にも分布しており、その刺激により、アドレナリンが血中に放出され、これらのカテコールアミンの作用により、心拍数や血圧の上昇、顔面の紅潮などの身体的変化が出現すると考えられている(Dimsdale, JE., Moss, J.: J. Am. Med. Assoc. Vol. 243, p340-342, 1980)。

ストレスが強力であったり、長期間続いたりすると、全身の諸臓器に影響を及ぼし、その結果重篤な心身症、すなわち、消化性潰瘍、虚血性心疾患、脳血管障害、高血圧、抗脂血症などを引き起こすこともある。

現在ストレスにより生じる精神的・身体的症状の軽減及び予防剤としては、精神安定剤、抗不安剤及び睡眠薬等の化学合成薬剤が使用されている。しかし、これらの薬剤は、習慣性や副作用の問題があり、ストレスにより生じる精神的、身体的症状予防の目的で日常的に使用するのとは好ましくない。また、軽度精神的疲労の対処療法としては、リラクゼーションやアロマセラピーなどが知られているが、個人差が大きく長期間にかつ継続的に行う必要がある。

そのため、日常的に連用可能で、安全性の問題を含まない、ストレスにより生じる精神的・身体的症状の軽減及び予防効果を示す抗ストレス剤の開発が求められている。

これまでの研究により、縮合度3~20の環状及び／又は鎖状のポリL-乳酸混合物は、抗悪性腫瘍剤として有用であることが報告されている(特開平9-227388号公報および特開平10-130153号公報)。しかしながら、縮合度3~20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物がストレス抑制作用を発揮す

るかどうかの評価については報告されていない。

発明の開示

本発明は、ストレス抑制のために使用することができる新規な抗ストレス剤を提供することを解決すべき課題とした。より具体的には、本発明は、日常的に連用可能で、安全性が高く、ストレスにより生じる精神的・身体的症状を軽減及び予防できる抗ストレス剤を提供することを解決すべき課題とした。本発明はまた、ストレス抑制のための飲食品を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは、上記課題を解決することを目的とした検討を行うために、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物をラットに投与して、水浸拘束ストレス誘起胃粘膜損傷の発生の程度を検討した。その結果、ポリ乳酸混合物の投与により胃粘膜損傷の発生は有意に抑制されることが判明した。

本発明者らはまた、寒冷ストレスに暴露した糖尿病モデルマウスの生存率に及ぼすポリ乳酸混合物の効果を調べた。その結果、ポリ乳酸混合物を投与した場合の方が糖尿病モデルマウスの生存率が高くなることが判明した。

さらに本発明者らは、ストレス下においたマウスのリンパ球数、腫瘍の形成、および嫌氣的酵素活性を測定した。その結果、ポリ乳酸混合物の投与によりストレスに伴うリンパ球数の減少や嫌氣的酵素活性の亢進が抑制され、抗腫瘍効果が奏されることが実証された。

本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を含む抗ストレス剤が提供される。

本発明の抗ストレス剤は、例えば、ストレスに起因する医学的症状を予防又は改善するために使用することができ、より具体的には、ストレスに起因する免疫機能の低下の予防又は改善、ストレスに起因する潰瘍又は腫瘍の予防又は改善、並びに疾患患者のストレスに対する生存率の向上のため等に使用することができる。

好ましくは、ポリ乳酸中における反復単位である乳酸は実質的にL-乳酸から成る。

好ましくは、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、乳酸を不活性雰囲気下で脱水縮合し、得られた反応液のエタノールおよびメタノール可溶分を逆相カラムクロマトグラフィーに付し、pH2～3の25～50重量%のアセトニトリル水溶液で溶離後、pH2～3の90重量%以上のアセトニトリル水溶液で溶離した画分である。

好ましくは、脱水縮合を窒素ガス雰囲気下、段階的減圧及び昇温により行う。

好ましくは、逆相カラムクロマトグラフィーを、ODSカラムクロマトグラフィーにより行う。

本発明の別の側面によれば、上記した本発明の抗ストレス剤を含む、ストレス抑制のための飲食品が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、抗ストレス剤又はストレス抑制のための飲食品の製造における、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物の使用が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物の有効量をヒトなどの哺乳動物に投与することを含む、ストレスを抑制するための方法が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、製造例1で得られたポリ乳酸混合物の質量スペクトルを示す。

図2は、ラットにおける水浸拘束ストレス誘起胃粘膜損傷の発達に及ぼすCPLの影響を示すグラフである。

図3は、寒冷ストレスに暴露した糖尿病モデルマウスの生存率に及ぼすCPLの効果を示すグラフである。

図4は、糖尿病モデルマウスの空腹時血糖値の測定結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明する。

本発明の抗ストレス剤は、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を有効成分として含み、ストレスにより生じる精神的・身体的症状を軽減及び予防するために使用することができる。

本発明の抗ストレス剤の使用の対象となるストレスの原因（ストレッサー）は特に限定されない。ストレッサーとしては、例えば、物理的環境要因（温度、騒音、地震等）、社会・文化的状況（戦争、経済危機、政変等）、個人の環境条件（家庭、学校、職場等）の変動（転居、転校、転勤、退職等）、人間関係の軋轢、葛藤等の他、過労、外傷、身体病等の生物学的要因も含まれる。これらのストレッサーは、今日見られる多くの心身症において、その直接の発症要因となっているか、又はその発症に重要な作用を果たしていると考えられている。

ストレスとは、上記したようなストレスの原因（例えば、痛み、発熱などの疾病や障害などの身体的な刺激、社会や家庭における人間関係から生ずる緊張、不安、恐怖などの精神的刺激、さらに騒音とか気象変化などの物理的環境因子などが挙げられる）が生体に加わった際に、精神や身体に生ずるひずみと考えられている。

生体は何らかの障害を与えるような刺激に対し、その刺激に特有な反応を示すと同時に、刺激の種類に関係なく、共通の反応として交感神経－副腎髄質系と下垂体－副腎皮質系の活動が高まり、アドレナリンが分泌され、血圧が上昇し、脈拍数や呼吸数が増加する一方、副腎皮質からのコルチゾールというホルモンの分泌が増加し、生体が防御あるいは適応しようとする反応を示す。この反応はストレス反応と呼ばれ、次のようなしくみによって発生することが知られている。すなわち生体に身体的あるいは精神的ストレッサーが加わると、その情報は中枢神経系に達し、視床下部に及ぶ。ここからストレス反応の指令が出るが、その伝達は大きく二つの経路を介して行われる。その一つは交感神経系を介するもので、大部分は交感神経そのものが生体内の種々の器質に達し、神経末梢からノルアド

レナリンを放出して効果を発揮する。またその一部分は副腎髄質に達し、刺激によりアドレナリンを分泌せしめる。もう一つのストレス情報伝達経路は、視床下部から下垂体のACTHというホルモン分泌を刺激するホルモン（CRH）を放出することにより、下垂体からACTHが分泌され、これが血液により副腎皮質に運ばれて、副腎皮質を刺激して、コルチゾールというホルモンの分泌を促進する。

ストレス反応は、生体にとって防御反応という有用的な役割を担っているが、反応時にコルチゾールやアドレナリンが過剰に分泌されるため、多くの器質に対し有害に作用し、生体の恒常性が維持できなくなってストレス病が引き起こされると考えられている。すなわちコルチゾールの過剰により、胃や十二指腸の粘膜が破壊されて胃・十二指腸潰瘍が引き起こされたり、免疫機能を抑制するので、感染抵抗が低下したり、ガンが起り易くなる。アドレナリンの過剰は、高血圧や循環器疾患を引き起こし易くする。

本発明の抗ストレス剤を被検者に投与した場合、ストレスの負荷に応答して発生する免疫機能の低下等の生理的な指標の変化が、非投与時の場合と比べて小さくなる。従って、本発明の抗ストレス剤は、被検者のストレスを低減する効果があると考えられ、日常生活で感じる様々なストレスに起因する医学的症状の発症を防止したり、その症状を軽減、緩和させることができる。

ストレスに起因する医学的症状としては、免疫機能の低下、潰瘍又は腫瘍の発生、疾患患者の生存率の低下などが挙げられる。

ストレスに起因するより具体的な医学的症状としては、動脈硬化症、虚血性心疾患（狭心症、心筋梗塞）、本態性高血圧、心臓神経症、不整脈などの循環器系疾患や、気管支喘息、過呼吸症候群、神経性咳嗽などの呼吸器系疾患や、消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群、神経性食欲不振症、神経性嘔吐症、腹部膨満症、空気嚥下などの消化器系疾患や、肥満症、糖尿病、心因性多飲症、パセドウ病などの内分泌代謝系疾患や、偏頭痛、筋緊張性頭痛、自律神経失調症などの神経系疾患や、夜尿症、インポテンツ、過敏性膀胱などの泌尿器系疾患や、慢

性関節リウマチ、全身性筋痛症、脊椎過敏症などの骨筋肉系疾患や、神経性皮膚炎、円形脱毛症、多汗症、湿疹などの皮膚系疾患や、メニエール症候群、咽喉頭部異物感症、難聴、耳鳴り、乗物酔い、失声吃音などの耳鼻咽喉科領域の疾患や、原発性緑内障、眼精疲労、眼瞼けいれん、眼ヒステリーなどの眼科領域の疾患や、月経困難症、無月経、月経異常、機能性子宮出血、更年期障害、不感症、不妊症などの産婦人科領域の疾患や、起立性調節障害、再発性臍疝痛、心因性の発熱、夜驚症などの小児科領域の疾患や、腸管癒着症、ダンピング症候群、頻回手術症（ポリサージャリー）、形成手術後神経症などの手術前後の状態や、特発性舌痛症、ある種の口内炎、口臭症、唾液分泌異常、咬筋チェック、義歯神経症などの口腔領域の疾患や、神経症、うつ病、並びに腫瘍形成などを挙げることができる。

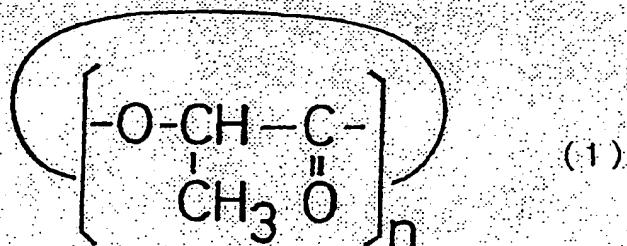
本発明の抗ストレス剤は、ストレスを受ける前に予め摂取しておくこと、ストレスを受けにくく、また、ストレスを受けても医学的症状の発症を防止しやすいという予防的作用を有する。従って、本発明の抗ストレス剤は、健康食品や医薬品として日頃から摂取しておくことも好ましい。

本発明の抗ストレス剤、及びストレス抑制のための飲食品においては、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物が有効成分として用いられる。

本明細書で言う「ポリ乳酸混合物」とは、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸が任意の割合で存在する混合物を意味する。即ち、「混合物」という用語は、縮合度3～20の何れかを有するポリ乳酸の混合物であることを意味すると同時に、環状および鎖状のポリ乳酸の混合物を含む概念としても用いられる。このような「ポリ乳酸混合物」は、本明細書中以下に述べるように、乳酸を脱水縮合し、適当な方法で精製することにより得ることができる。なお、本明細書では便宜上「ポリ乳酸混合物」という用語を用いたが、この中には一定の縮合度を有する環状のポリ乳酸または一定の縮合度を有する鎖状のポリ乳酸といった単一成分から成るポリ乳酸も含まれる。

縮合度とは、ポリ乳酸中における反復単位である乳酸単位の数を意味する。例えば、環状のポリ乳酸は下記の構造式を有することが推測されるが、式中のnが

縮合度を表す（即ち、 $n = 3 \sim 20$ ）。



本明細書で単に「乳酸」と称する場合、この乳酸にはL-乳酸、D-乳酸またはこれらの任意の割合の混合物の全てが包含される。本発明においては好ましくは、乳酸は実質的にL-乳酸から成る。ここで言う「実質的に」とは、ポリ乳酸混合物中におけるL-乳酸単位の比率[即ち、 $(\text{L-乳酸単位数} / \text{L-乳酸単位数} + \text{D-乳酸単位数}) \times 100$]が、例えば70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上であることを意味する。なお、ポリ乳酸混合物中におけるL-乳酸単位の比率は、出発物質として使用する乳酸中に存在するL-乳酸とD-乳酸の比率に依存する。

縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物の製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、特開平9-227388号公報、特開平10-130153号公報、または特願平11-39894号明細書（これらの特許明細書に記載の内容は全て引用により本明細書の開示として含める。）などに記載の製造方法により得ることができる。

より具体的には、例えば、縮合度3～20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、下記の方法Aにより得ることができる。

方法A：

先ず、乳酸（好ましくは、実質的にL-乳酸から成る乳酸）を不活性雰囲気下で脱水縮合させる。不活性雰囲気としては、例えば、窒素ガス、アルゴンガスな

どが挙げられるが、窒素ガスを用いるのが好ましい。

脱水縮合反応は、常圧～1 mmHg 程度の減圧下、110～210℃、好ましくは130～190℃の温度で行われるが、段階的減圧および段階的昇温によって行うのが特に好ましい。反応時間は適宜設定できるが、例えば1～20時間反応を行うことができる。段階的減圧および段階的昇温を用いる場合には、反応時間を2以上から成る部分的な反応時間に分け、それぞれの部分において圧力と温度を設定して反応を行う。段階的減圧を用いる場合は、例えば、常圧→150 mmHg→3 mmHg と減圧することができ、段階的昇温を用いる場合は、例えば、145℃→155℃→185℃と昇温することができる。実際には、これらを組み合わせ、例えば、145℃で常圧で3時間、145℃で150 mmHg で3時間、155℃で3 mmHg で3時間そして185℃で3 mmHg で1.5時間反応を行うことができる。

次いで、この脱水縮合反応により得られた反応混合物にエタノールおよびメタノールを加え、濾過して濾液を乾燥してエタノールおよびメタノール可溶分が得られる。即ち、本明細書で言う「エタノールおよびメタノール可溶分」とはエタノールとメタノールの混合液に可溶な画分を意味する。なお、エタノールおよびメタノール可溶分を得る際には、脱水縮合反応の反応混合物をエタノールおよびメタノールと混合するが、その際のエタノールとメタノールの比率は適宜設定することができ、例えばエタノール：メタノール＝1：9である。なお、反応混合物にエタノールとメタノールを添加する順番、方法などは限定されず、適宜選択することができ、例えば、脱水縮合反応の反応混合物に先ずエタノールを添加し、次いでメタノールを添加することができる。

上記で得られたエタノール・メタノール可溶分を逆相カラムクロマトグラフィー、特にオクタデシルシラン（ODS）カラムを用いたクロマトグラフィーに付し、まずpH 2～3の25～50重量%のアセトニトリル水溶液で溶離する画分を除去し、次いでpH 2～3の90重量%以上のアセトニトリル水溶液、好ましくは99重量%以上のアセトニトリル水溶液で溶離してくる画分を採取すると、

縮合度 3～20 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物が得られる。

上記のようにして得られた環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、水酸化ナトリウムなどのアルカリ物質で中和し、減圧乾燥後、常法により下記に述べるような所望の形態に製剤化することができる。

本発明で用いる縮合度 3～20 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を製造するための別法としては、例えば、特願平 11-265715 号明細書に記載された方法（方法 B とする）または特願平 11-265732 号明細書に記載された方法（方法 C とする）を挙げることができる（これらの特許明細書に記載の内容は全て引用により本明細書の開示として含める。）。以下、方法 B および方法 C について具体的に説明する。

方法 B：

この方法は、ラクチドを $RYLi$ （式中、R は脂肪族基又は芳香族基を示し、Y は酸素原子又はイオウ原子を示す）で表されるリチウム化合物の存在下で重合させることによって環状乳酸オリゴマーを製造する方法である。重合反応を実施する場合、リチウム化合物（ $RYLi$ ）の使用割合は、ラクチド 1 モル当たり、1～0.1 モル、好ましくは 0.2～0.3 モルの割合である。反応温度は $-100\sim 0^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-78\sim -50^{\circ}\text{C}$ である。反応は、 $-78\sim -50^{\circ}\text{C}$ の温度で開始し、徐々に室温にまで昇温させるように実施するのが好ましい。反応は、好ましくは反応溶媒の存在下で実施される。反応溶媒としては、テトラヒドロフラン等の環状エーテルの他、ジエチルエーテル、ジメトキシエタン等を用いることができる。反応雰囲気としては、窒素ガスやアルゴン等の不活性ガス雰囲気が用いられる。反応圧力は特に制約されず、好ましくは常圧である。

なお、上記のようにして得られる乳酸オリゴマーの組成（即ち、環状乳酸オリゴマーと鎖状乳酸オリゴマーの混合比率）は、反応助剤として用いるリチウム化合物によって変動する。リチウム化合物として炭素数 1～3 のアルキルアルコールのリチウム化合物（ $ROLi$ ）（式中、R は炭素数 1～3 のアルキル基）を用

いる場合には、環状乳酸オリゴマーと鎖状オリゴマーとの混合物（環状乳酸オリゴマーの割合：80～85重量%）が得られる。一方、リチウム化合物としてt-ブチルアルコール等の炭素数4以上のアルキルアルコールのリチウム化合物や、チオフェノール化合物を用いるときには、実質的に環状乳酸オリゴマーのみを選択的に得ることができる。

方法C：

この方法は、(i) 乳酸を350～400 mmHgの圧力条件で120～140℃の範囲の温度に加熱し、脱水縮合反応させるとともに、ラクチドを留出させずに副生水のみを留出除去する第1加熱工程、

(i i) 該第1加熱工程終了後、反応生成物を150～160℃の温度に加熱し、該反応圧力を降圧速度0.5～1 mmHg/分で15～20 mmHgまで降下させるとともに、その降圧に際し、ラクチドの留出を回避させながら副生水のみを留出除去し、該反応圧力が15～20 mmHgに降下後、同圧力条件及び反応温度150～160℃においてさらに反応を継続して鎖状乳酸オリゴマーを主成分とする脱水縮合物を生成させる第2加熱工程、

(i i i) 該第2加熱工程終了後、0.1～3 mmHgの圧力条件で150～160℃で加熱して該鎖状乳酸オリゴマーを環化させ、環状オリゴマーを生成させる第3加熱工程、

からなることを特徴とする方法である。

この方法ではまず、第1加熱工程において、減圧下において乳酸を加熱し、脱水縮合反応させる。この場合の反応時間は3～12時間、好ましくは5～6時間である。この第1加熱下での反応は、その反応を円滑に進行させるために、乳酸の脱水縮合により生成する副生水を留去させるが、この場合、乳酸2分子の脱水縮合物であるラクチドが留去しないように実施する。このためには、反応圧力を減圧、好ましくは300～500 mmHg、より好ましくは350～400 mmHgに保持し、この圧力条件下において、100～140℃、好ましくは130

～140℃の範囲に加熱するのがよい。この第1加熱工程での反応により、主に、乳酸の3～23分子の脱水縮合物を主成分とする反応生成物が生じる。

上記第1加熱工程の終了後、第2加熱工程において、高められた平均重合度のオリゴマーが得られるように、前記第1加熱工程における反応温度よりも高められた温度、好ましくは145～180℃、より好ましくは150～160℃の温度に加熱するとともに、反応圧力を10～50 mmHg、好ましくは15～20 mmHgの圧力に降下させてさらに脱水縮合反応を継続する。

この反応も、前記第1加熱工程の反応の場合と同様に、反応を円滑に進行させるために副生水を留去させるが、ラクチドが留去しない条件で実施する。反応圧力を前記範囲の圧力にまで降下させる速度（降圧速度）は、ラクチドの留出を回避し、且つ反応効率を高めるためには、0.25～5 mmHg/分、好ましくは0.5～1 mmHg/分の範囲に保持することが通常は必要である。前記範囲より低い降圧速度では、その所定圧まで降圧させるのに必要な時間が長くなるため好ましくなく、一方、前記範囲より高い降圧速度では、ラクチドが副生水とともに留去するようになるので好ましくない。

反応圧力が所定圧力にまで降下後、この反応圧力において、さらに反応を継続する。この場合の加熱時間は、3～12時間、好ましくは5～6時間である。

前記第2加熱工程での反応により、平均重合度が3～30、好ましくは3～23の乳酸オリゴマーが得られるが、この場合のオリゴマー中の環状オリゴマーの割合は、通常、70～80重量%程度である。

上記第2加熱工程終了後、第3加熱工程において、反応圧力を0.25～5 mmHg、好ましくは0.5～1 mmHgに保持し、145～180℃、好ましくは150～160℃の温度でさらに反応を継続する。反応時間は3～12時間、好ましくは5～6時間である。この場合に生じる副生水も留去させる。この場合、ラクチドの留去も回避させることが好ましいが、反応生成物にはラクチドは殆んど含まれないので、その降圧速度を格別遅くする必要はない。

前記第3加熱工程での反応により、平均重合度3～30、好ましくは3～23

で、かつ環状オリゴマーの割合が90重量%以上、好ましくは99重量%以上の乳酸オリゴマーが生成される。

なお、上記方法A、BおよびCは本発明で用いるポリ乳酸混合物の製造方法の具体例の一部を示したものにすぎず、本発明においては他の方法で製造されたポリ乳酸混合物を用いることもできる。

本発明の抗ストレス剤の効果は、例えば実験動物を使用し、水浸拘束ストレス誘起法により胃粘膜損傷を生じさせることにより確認することができる。具体的には、実験動物（例えば、ラットなど）をストレスケージに入れ、1.0時間で22～23℃の水槽に剣状突起の高さまで浸し、ストレス負荷する。薬物はストレス負荷する前に投与する。次いで、実験動物をエーテル麻酔下に開腹し、胃を摘出し、噴門部結紮後2%ホルマリン液を十二指腸より胃内に注入し、固定する。また漿膜側からも同液中に浸すことにより固定する。その後、大弯に沿って切開し、胃粘膜損傷の長さを測定する。胃粘膜損傷の大きさが対照群よりも小さくなることにより、本発明の抗ストレス剤の効果を確認できる。

本発明の抗ストレス剤の効果は、閉所拘束ストレスを付与した実験動物におけるリンパ球数の変動を測定することによっても確認することができる。具体的には、実験動物（例えば、マウスなど）をアクリルケースに収容して飼育し、抗ストレス剤を含む固形食を摂取させる。固形食の投与開始後、毎週1回、マウスを細い円筒の中に一定時間入れて閉所拘束ストレスを4週間(4回)与える。拘束を終了した後、直ちにジエチルエーテル麻酔下で尾静脈から血液を採血し、光学顕微鏡下でリンパ球数を計測する。ストレスによるリンパ球数の減少が抑制されることにより、本発明の抗ストレス剤の効果を確認できる。

本発明の抗ストレス剤は、前記の必須成分に加えてさらに必要に応じ、本発明の効果を損なわない範囲内で、医薬品類、医薬部外品類などの製剤に使用される成分や添加剤を任意に選択・併用して製造することができる。本発明の抗ストレス剤は、単独の医薬品類として使用できる以外に、医薬品類や医薬部外品類などに配合して用いることもできる。

本発明の抗ストレス剤の形態は特に限定されず、経口投与又は非経口投与用の製剤形態の中から目的に最も適した適宜の形態のものを選択することが可能である。

経口投与に適した製剤形態としては、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、ドリンク剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤、溶液剤、乳剤、懸濁剤、チュアブル剤などを挙げることができ、非経口投与に適する製剤形態としては、例えば、注射剤（皮下注射、筋肉内注射、又は静脈内注射など）、外用剤、点滴剤、吸入剤、噴霧剤などが挙げられるが、これらに限定されることはない。

経口投与に適当な液体製剤、例えば、溶液剤、乳剤、又はシロップ剤などは、水、ショ糖、ソルビット、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを用いて製造することができる。また、カプセル剤、錠剤、散剤、又は顆粒剤などの固体制剤の製造には、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニットなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニールアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いることができる。

非経口投与に適当な注射用又は点滴用の製剤は、好ましくは、受容者の血液と等張な滅菌水性媒体に有効成分である上記の物質を溶解又は懸濁状態で含んでいる。例えば、注射剤の場合、塩溶液、ブドウ糖溶液、又は塩水とブドウ糖溶液との混合物からなる水性媒体などを用いて溶液を調製することができる。腸内投与のための製剤は、例えば、カカオ脂、水素化脂肪、又は水素化カルボン酸などの担体を用いて調製することができ、座剤として提供される。また、噴霧剤の製造には、有効成分である上記の物質を微細な粒子として分散させることができ、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ有効成分の吸収を容易ならしめる担体を用いることができる。担体としては、具体的には、乳糖又はグリセリンなど

が例示される。有効成分である物質及び使用する担体の性質に応じて、エアロゾル又はドライパウダーなどの形態の製剤が調製可能である。これらの非経口投与用製剤には、グリコール類、油類、フレーバー類、防腐剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤などから選択される1種又は2種以上の飲食品を添加することもできる。

本発明の抗ストレス剤の投与量及び投与回数は、投与の目的、投与形態、摂取者の年齢、体重又は性別などの条件などを含む種々の要因により適宜設定することができるが、一般的には、有効成分の投与量として一日当たり1~10,000 mg/kg、好ましくは10~2000 mg/kg、より好ましくは10~2000 mg/kgである。上記投与量の製剤を一日1~4回程度に分けて投与することが好ましい。

本発明の抗ストレス剤の投与時期は特に限定されず、ストレス負荷が予想される時、またはストレス負荷時に服用して、ストレスの予防または軽減を計る他、常用により、ストレスを予防または軽減することができる。

本発明はさらに、縮合度3~20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を含むストレス抑制のための飲食品にも関する。即ち、本発明で用いる縮合度3~20の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、上記したような単独の製剤の形態で使用するのみならず、飲食品の中に配合して用いることができる。

本発明のストレス抑制のための飲食品は、ポリ乳酸混合物を分解させることなく配合し得るものであれば、その配合形態には特に制限はない。

本発明によるストレス抑制のための飲食品の製品の具体例としては、清涼飲料、ドリンク剤、健康食品、特定保健用食品、機能性食品、機能活性型食品、栄養補助食品、サプリメント、飼料、飼料添加物などと一般に呼称される、飲料を含む健康食品または補助食品が挙げられる。

飲食品の具体例としては、例えば、チューインガム、チョコレート、キャンディー、錠菓、ゼリー、クッキー、ビスケット、ヨーグルト等の菓子類、アイスクリーム、氷菓等の冷菓類、茶、清涼飲料（ジュース、コーヒー、ココア等を含む）、

栄養ドリンク剤、美容ドリンク剤等の飲料、パン、ハム、スープ、ジャム、スパゲティー、冷凍食品など任意の飲食品を挙げることができる。あるいは、本発明で用いるポリ乳酸混合物は調味料又は食品添加剤などに添加して用いることもできる。本発明の飲食品を摂取することによりストレス抑制効果が発揮され、実質的に有害な副作用を示さない安全な飲食品を提供することができる。

本発明のストレス抑制のための飲食品は、ポリ乳酸混合物を、食品に使われる一般的な原料に直接混合、分散したのち、公知の方法により所望の形態に加工することによって得ることができる。

本発明のストレス抑制のための飲食品はあらゆる形態の飲食品を包含するものであり、その種類は特に制限されず、上記したような各種飲食物、あるいは各種栄養組成物、例えば各種の経口又は経腸栄養剤や飲料等に、本発明の抗ストレス剤を配合して飲食品として提供することができる。このような飲食品の組成としては、縮合度 3～20 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物の他に、蛋白質、脂質、糖質、ビタミン及び／又はミネラル類などを含めることができる。飲食品の形態は特に限定されず、摂取しやすい形態であれば、固形、粉末、液体、ゲル状、スラリー状等のいずれであってもよい。

飲食品中におけるポリ乳酸混合物の含有量は特に限定されないが、一般的には 0.1～20 重量%、より好ましくは 0.1～10 重量%程度である。

飲食品に含まれるポリ乳酸混合物の量は、本発明の目的とするストレス抑制作用を発揮できる程度に含まれることが好ましく、好ましくは摂取される飲食物 1 食中に 0.1 g から 10 g 程度、より好ましくは 0.5 g から 3 g 程度である。

なお、本出願が主張する優先権の基礎となる日本特許出願である特願 2001-16145 号の明細書に記載の内容は全て、本明細書の開示の一部として本明細書中に引用するものとする。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によっていかなる点においても限定されることはない。

実施例

製造例1：ポリ乳酸混合物（以下、CPLとも称する）の製造

マントルヒーターに収めたセパラブルフラスコにL-乳酸（D-乳酸も混入しているもの）500mlを入れた。窒素ガス300ml/分の流入及び攪拌を行い、溜出水は保温した下降型接続管を経て還流冷却器付フラスコに導きながら、14.5℃で3時間加熱した。更に150mmHgに減圧して同温度で3時間加熱した後、3mmHgの減圧下15.5℃で3時間、最後に3mmHgの減圧下18.5℃で1.5時間加熱し、反応生成物であるポリ乳酸を得た。

得られたポリ乳酸は100℃に保ち、エタノール100mlに続いてメタノール400mlをそれぞれ加えた後放冷した。これをメタノール500ml中に加え、よく攪拌して静置した後濾過して精製した。その濾液を減圧乾燥してアセトニトリルに溶解し、全量を200ml（原液）とした。

この原液を、予め平衡化した逆相ODSカラム（TSK gel ODS-80TM）にかけ、0.01M塩酸を含む30%、50%および100%アセトニトリル（pH2.0）でステップワイズに溶離し、アセトニトリル100%溶出画分であるポリ乳酸（縮合度3～20）を得た。得られた物質の質量スペクトルを図1に示す。図1中の規則的なフラグメントイオンピークから明らかなように、得られたポリ乳酸の混合物は、環状縮合体を主体とし、直鎖状縮合体が少量混在した状態になっている。

試験例1：モデルラットにおける水浸拘束ストレス誘起胃粘膜損傷に対するCPLの効果

（材料及び方法）

実験には6週令の雄性Donryu系ラット（日本SLC、実験時体重180～200g）を使用した。

CPLは40℃に加温したグリセリンで溶解させた後、プロピレングリコールを加えて100mg/mlに調整した。その後、蒸留水で希釈し、50mg/kg

gの用量にした。薬物は体重200gあたり1mLの割合で1日に1回ずつ10日間経口投与した。対照群として溶媒のみを同用量で経口投与した。

水浸拘束ストレス誘起胃粘膜損傷を以下の通り作製した。ラットは実験開始前18時間は絶食し、水の摂取は実験開始2時間前までは自由とし、以後絶水した。ラットを東大薬作型ストレスケージ（夏目製作所）に入れ、10時間で22～23℃の水槽に剣状突起の高さまで浸し、ストレス負荷することにより作製した。なお薬物はストレス負荷する30分前に再び投与した。

胃損傷面積の測定は以下の通り行なった。エーテル麻酔下に開腹し、胃を摘出した。噴門部結紮後2%ホルマリン液8mLを十二指腸より胃内に注入し10分間固定した。また漿膜側からも同液中に10分間浸すことにより固定した。その後、大弯に沿って切開し、実体顕微鏡に損傷の長さ（mm）を測定した。

結果は平均値±標準誤差(mean±S.E. ; N=10～11)で表示した。統計学的有意性の検討はStudent's t-testを用い、 $P<0.05$ を有意とした。

(結果)

測定結果を以下の表1および図2に示す。

表1：胃粘膜損傷 (mm)

	対照	C P L (50mg/kg)
1	20.0	8.0
2	22.0	19.0
3	20.0	6.0
4	19.0	16.0
5	15.0	18.0
6	16.0	15.0
7	12.0	10.0
8	12.0	16.0
9	15.0	10.0
10	28.0	15.0
11		11.0
平均	17.9	13.1
標準偏差	1.6	1.3

表1及び図2に示す通り、ストレス負荷することにより誘起される損傷の総和の平均は 17.9 ± 1.6 mmであったのに対し、C P Lの10日間連続投与により水浸拘束ストレス誘起胃粘膜損傷の発生は有意に抑制され、損傷の総和の平均は 13.1 ± 1.3 mmであった。

試験例2：寒冷ストレスに暴露した糖尿病モデルマウスの生存率に及ぼすC P Lの効果

(方法)

日本クレア株式会社に委託し、栄養素の含有率は標準固形食C E 2と同じで、C P Lを1%含む特別固形食(1% C P L食)を作製した。

日本クレア株式会社より6週令のI I型糖尿病発症マウス(C57-db/db)の雌を購入した。購入後直ちに標準固形食CE 2を食べさせるCE 2群と、特別食(1% CPL食)を食べさせるCPL群の2群に分けた。水は水道水を自由摂取させた。床敷きは日本クレア社製の実験動物用床敷熱乾燥「クリーンチップ」を用い、毎日交換した。

血糖値の測定の前日の18:00に餌を抜き、当日の08:30~09:30の間に採血した。採血後0.01mlの血液に0.12mlの5%-TCAを加えて攪拌し、10,000rpmで5分間遠心分離して得られた上清を試料とした。グルコースをオートルイジナーハウ酸法で測定することにより血糖値の測定を行なった。

熱量計として電子科学株式会社製全身熱量計BioDynamic Calorimeter BDC-200を用いて放出熱量の測定を行なった。マウスを09:00に全身熱量計に入れ、翌日の17:00に取り出した。熱量測定中も餌と水は自由に取らせた。

(結果)

寒冷ストレスに暴露した糖尿病モデルマウスの生存率に及ぼすCPLの効果を図3に示す。CE 2群は飼育開始後92日に実施した熱量測定による31時間の寒冷暴露で6例中4匹が死亡し、残る2匹も、飼育開始後181日と254日に死亡した。CPL群は飼育開始後82日に実施した熱量測定による31時間の寒冷暴露で6例中1匹が死亡し、飼育開始242日に1匹が死亡したが、4匹が現存している。

空腹時血糖値の測定結果を図4に示す。現存しているCPL群の4匹の飼育開始後310日の平均空腹時血糖値は210mg/dl、飼育開始後432日の平均空腹時血糖値は170mg/dlであった。

現存しているCPL群4個体の空腹時血糖値を表2に示す。4個体中3個体の飼育開始後472日の空腹時血糖値は、飼育開始後78日の空腹時血糖値よりも大幅に低下していた。特にdb/db④と⑥の空腹時血糖値は正常値を示した。この2個体は摂食後でも尿糖は検出されなかった。

表2. 空腹時血糖値に及ぼすCPLの長期効果

動物	飼育期間 (日)			
	7 8	1 4 8	4 3 2	4 7 2
db/db①	3 7 1	2 7 7	2 0 9	1 6 2
db/db④	4 3 4	3 4 0	1 7 6	9 9
db/db⑤	3 6 2	3 8 9	2 2 1	3 5 4
db/db⑥	2 0 2	1 6 8	8 4	9 1

また、放出熱量に及ぼすCPLの効果を表3に示す。飼育開始後140日のCPL群の平均放出熱量は32.0 kJ/日で、db/一群の77%であった。飼育開始後480日の平均放出熱量は41.5 kJ/日で、飼育開始後140日のdb/一群の値と同じであった。

表3. 放出熱量 (自由熱) に及ぼすCPLの効果

	1 4 0 日	4 8 0 日
db/-、CE2 (n=4)	41.3±4.0	
db/db、CE2 (n=6)	22.5±7.7	
db/db、CPL (n=6)	32.0±4.8	41.5±10.2 (n=4)

上記の通り、CPLを含まない標準食で飼育していたdb/dbマウスの生存期間は短く、6匹全てが生後約10ヶ月で死んだ。1%CPL含有餌飼育群では6匹中4匹が生存している。生存しているマウス4匹中2匹の空腹時血糖値は正常範囲であり、尿糖も検出されなかった。すなわち、II型糖尿病が治癒していた。4匹中1匹の高血糖もほぼ正常値にまで改善され、尿糖は検出されたが、わずかであった。

試験例3：閉所拘束ストレスを付与したマウスにおけるリンパ球数の変動に及ぼすCPLの効果

(方法)

4週齢の雄CBA/JNCrマウスをアクリルケースに収容して飼育した。マウスは、標準固形食CE2(日本クレア株式会社より入手)を自由摂取させたコントロール群とし、上記標準固形食に0.1%重量のポリ乳酸混合物(CPL)を含む標準固形食CE2(日本クレア株式会社に依頼して入手)を自由摂取させたCPL群とにわけた。CPL投与開始後、毎週1回、マウスを細い円筒(直径2.7cm、奥行き9.5cm)の中に1.9時間(17:00～翌朝9:00)入れて閉所拘束ストレスを4週間(4回)与えた。拘束を終了した後、直ちにジエチルエーテル麻酔下で尾静脈から0.005mlの血液を採血し、光学顕微鏡下でリンパ球数を計測した。

(結果)

リンパ球数を計測した結果を表4に示す。表4に示すようにコントロール群のリンパ球数は閉所拘束ストレス開始後、3週目まで直線的に減少し、実験開始前の約30%に低下し、4週目でもその値に変動は認められなかった。CPL群では、1回目の閉所拘束ストレス実験後コントロール群と同様、リンパ球の減少が認められたが、その後閉所拘束ストレスを繰り返してもリンパ球数はほぼ同等の数を維持した。

表4：閉所拘束ストレスによって起こるリンパ球数の変化をCPL群とコントロール群で比較した表

リンパ球の個数($\times 10^4/\text{mm}^3$)					
実験期間	開始時	1週目	2週目	3週目	4週目
コントロール群	33.6 \pm 10.7 ^{a)}	26.5 \pm 4.3	17.7 \pm 7.1 ^{b)}	10.8 \pm 2.0 ^{c)}	12.1 \pm 4.9 ^{d)}
CPL群	29.3 \pm 8.5	22.0 \pm 4.4	23.9 \pm 6.6	25.5 \pm 5.8	24.6 \pm 4.7

a): 平均値 \pm 標準偏差

コントロール群の実験開始時の値に比べた t 検定有意差:

- b) $p < 0.05$
- c) $p < 0.001$
- d) $p < 0.01$

試験例4：ストレス下におけるCPLによる発癌抑制効果

試験例3で使用したマウスは、肺胞上皮過形成を自然発癌する系統のマウスである。これまでの研究から、腫瘍組織は嫌氣的解糖系に依存してエネルギーを得ているが、CPLはこの解糖系を抑制することにより上記発癌を抑制する効果を有する物質であることが認められている(第56回日本癌学会総会記事第605頁；日本癌治療学会誌第32巻第5号第165頁；第57回日本癌学会総会記事第646頁；日本癌治療学会誌第33巻第3号第222頁)。そこで、試験例3と同様の条件下でマウスを飼育し、本ストレス下における発癌抑制効果を検討した。

実験群は、標準固形食CE2(日本クレア株式会社より入手)を自由摂取させた群をコントロールとし(ストレス群)、上記標準固形食に0.1%重量のCPLを含む標準固形食CE2(日本クレア株式会社に依頼して入手)を自由摂取させた群(ストレスCPL群)に対して試験例1と同様の閉所拘束ストレスを加えた。さらに、ストレスを与えない条件下でCE2を与えて飼育した群(CE2群)、CPLを含むCE2を与えて飼育した群(CPL群)も対照とした。

上記4群を3.0週目まで飼育し、2.0週目と3.0週目にジエチルエーテル麻酔下で安楽死させ、肺を摘出した。肺の組織切片を作成し、肺胞上皮過形成の割合を光学顕微鏡で観察した結果を表5と表6に示す。表5は、投与開始後2.0週目に肺における腫瘍範囲を比較した表である。各群6個体(1個体当たり5~8ヶ所)の組織病理切片中に含まれる腫瘍範囲を観察した結果を%で示す。表6は、投与開始後3.0週目に肺における腫瘍範囲を比較した表である。各群6個体(1個体当たり5~8ヶ所)の組織病理切片中に含まれる腫瘍範囲を観察した結果を%で示す。

表 5 : 投与開始後20週目に肺における腫瘍範囲を比較した表。

	肺の組織病理切片中における肺胞上皮過形成の範囲(%)				
	10%以下	10~30%未満	30~50%未満	50~80%未満	80%以上
CE2群	36.1	25.0	33.3	2.8	2.8
CPL群	51.4	29.7	16.2	2.7	0.0
ストレス群	21.1	26.3	13.2	23.7	13.2
ストレスCPL群	44.4	30.6	16.7	8.3	0.0

表 6 : 投与開始後30週目に肺における腫瘍範囲を比較した表である。

	肺の組織病理切片中における肺胞上皮過形成の範囲(%)				
	10%以下	10~30%未満	30~50%未満	50~80%未満	80%以上
CE2群	42.4	12.1	27.3	12.1	6.1
CPL群	69.2	15.3	11.5	3.8	0.0
ストレス群	25.7	2.9	11.4	34.3	25.7
ストレスCPL群	41.2	17.6	14.7	11.8	11.8

表5の結果から、CE2を与えて飼育したマウスは、ストレス条件下では腫瘍範囲が拡大した。しかし、CPLを与えて飼育したマウスでは、ストレスの有無による腫瘍範囲の違いは認められなかった。つまり、腫瘍範囲が50%を超えるものの割合は、CE2を摂取した場合、ストレスを与えることによって5.4%が36.9%に増加したのに対し、CPLを摂取した場合には、ストレスを与えても8.3%であった。

また、表6の結果から、30週間CE2を与えて飼育したマウスにおいて、50%を超える腫瘍範囲の割合は、20週目に比べ3.25倍の18.2%であった。この飼料を与えたマウスをストレス条件下で飼育すると60%に増加したが、CPLを投与した場合には23.6%であった。

さらに、30週目に安楽死させたマウスの肺をホモジェナイズした試料を遠心分離して上清を作成し、嫌氣的解糖系の酵素活性、つまり、ヘキソキナーゼ (HK)、ホスフォフルクトキナーゼ (PFK)、ピルビン酸キナーゼ (PK) および乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定した。その結果を表7に示す。

表7：30週目の嫌氣的解糖系の酵素活性

	HK	PFK	PK	LDH
CE2群(ストレスなし)	75.5±7.7 ^{a)}	48.3±4.5	224.0±28.5	1330±105
ストレス群	91.7±4.9 ^{b)}	64.0±4.4 ^{c)}	274.0±32.0 ^{d)}	1531±99 ^{b)}
ストレスCPL群	69.4±8.7	51.6±7.6	229.0±28.1	1364±172

a): 平均値±標準偏差

CE2群とストレス群との間の t 検定有意差：

b) $p < 0.01$

c) $p < 0.001$

d) $p < 0.05$

この結果から分かるように、閉所拘束ストレスによって肺における糖代謝の律速酵素活性が有意に上昇した。しかしながら、CPL投与によってこれらの酵素活性はいずれもCE2群との間に有意差はなかった。

試験例3および試験例4の結果から、CPL投与によってストレスに伴うリンパ球数の減少や嫌氣的酵素活性の亢進が抑制され、抗腫瘍効果が奏されることが実証された。

産業上の利用の可能性

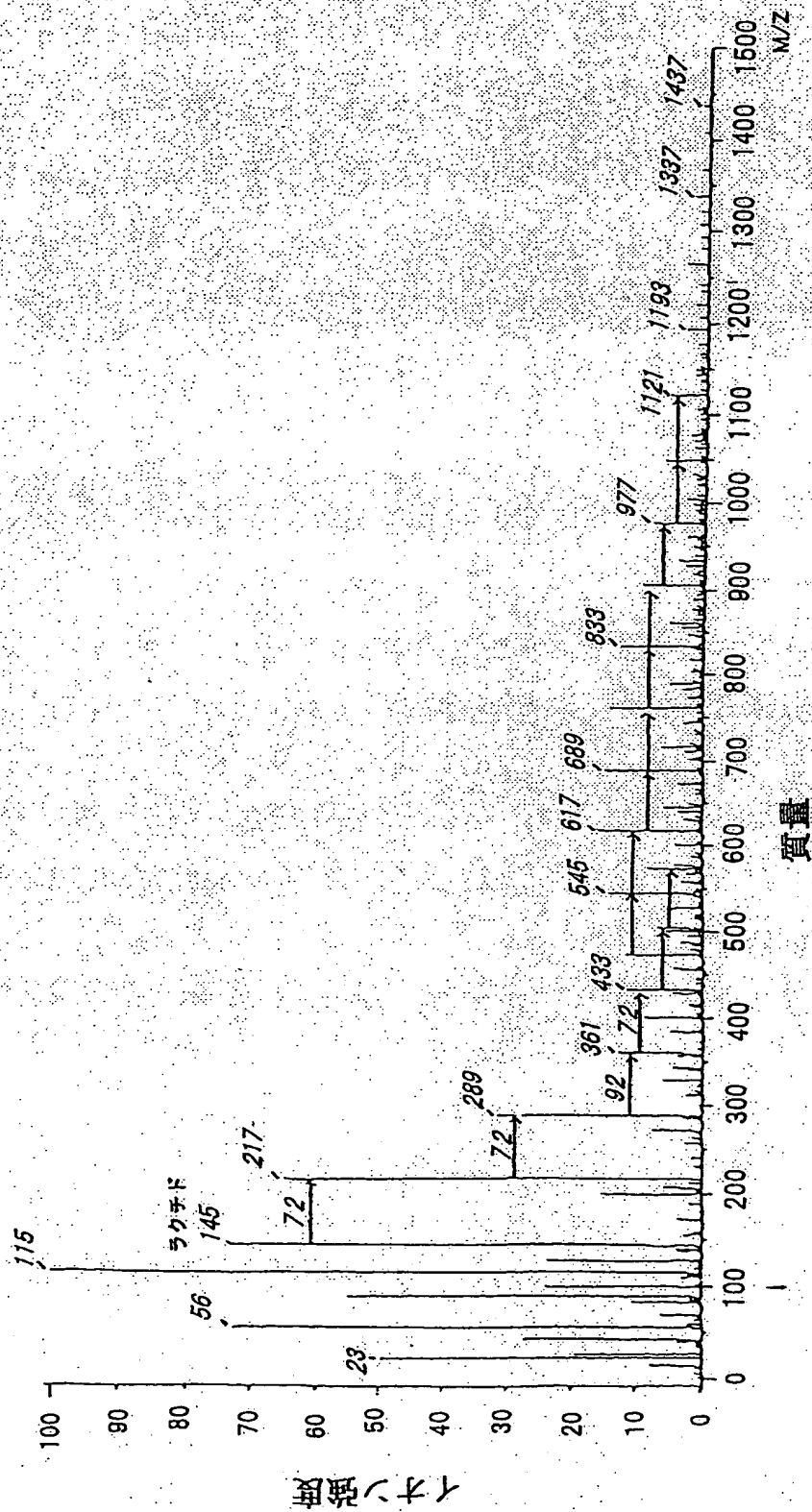
本発明の抗ストレス剤は、各種ストレスの軽減又は予防のために使用することができる。また、本発明において有効成分として用いられるポリ乳酸混合物は、生体成分に由来する乳酸の低縮合体であることから、生体適合性が高く、副作用

が少ない。従って、本発明の抗ストレス剤は、安全性に優れ、使用に際して特別な制限がなく、例えばドリンク剤等としてストレスを予防および／または軽減するために、日常的に用いることも可能である。

請求の範囲

1. 縮合度 3～20 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を含む抗ストレス剤。
2. ストレスに起因する医学的症状を予防又は改善するため、請求項1に記載の抗ストレス剤。
3. ストレスに起因する免疫機能の低下を予防又は改善するための、請求項1又は2に記載の抗ストレス剤。
4. ストレスに起因する潰瘍又は腫瘍を予防又は改善するための、請求項1又は2に記載の抗ストレス剤。
5. 疾患患者のストレスに対する生存率を向上させるための、請求項1又は2に記載の抗ストレス剤。
6. ポリ乳酸中における反復単位である乳酸が実質的にL-乳酸から成る、請求項1から5の何れか1項に記載の抗ストレス剤。
7. 縮合度 3～20 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物が、乳酸を不活性雰囲気下で脱水縮合し、得られた反応液のエタノールおよびメタノール可溶分を逆相カラムクロマトグラフィーに付し、pH 2～3 の 25～50 重量%のアセトニトリル水溶液で溶離後、pH 2～3 の 90 重量%以上のアセトニトリル水溶液で溶離した画分である、請求項1から6の何れか1項に記載の抗ストレス剤。
8. 脱水縮合を窒素ガス雰囲気下、段階的減圧及び昇温により行う、請求項7に記載の抗ストレス剤。
9. 逆相カラムクロマトグラフィーを、ODSカラムクロマトグラフィーにより行う請求項7又は8に記載の抗ストレス剤。
10. 請求項1から9の何れかに記載の抗ストレス剤を含む、ストレス抑制のための飲食品。

図 1



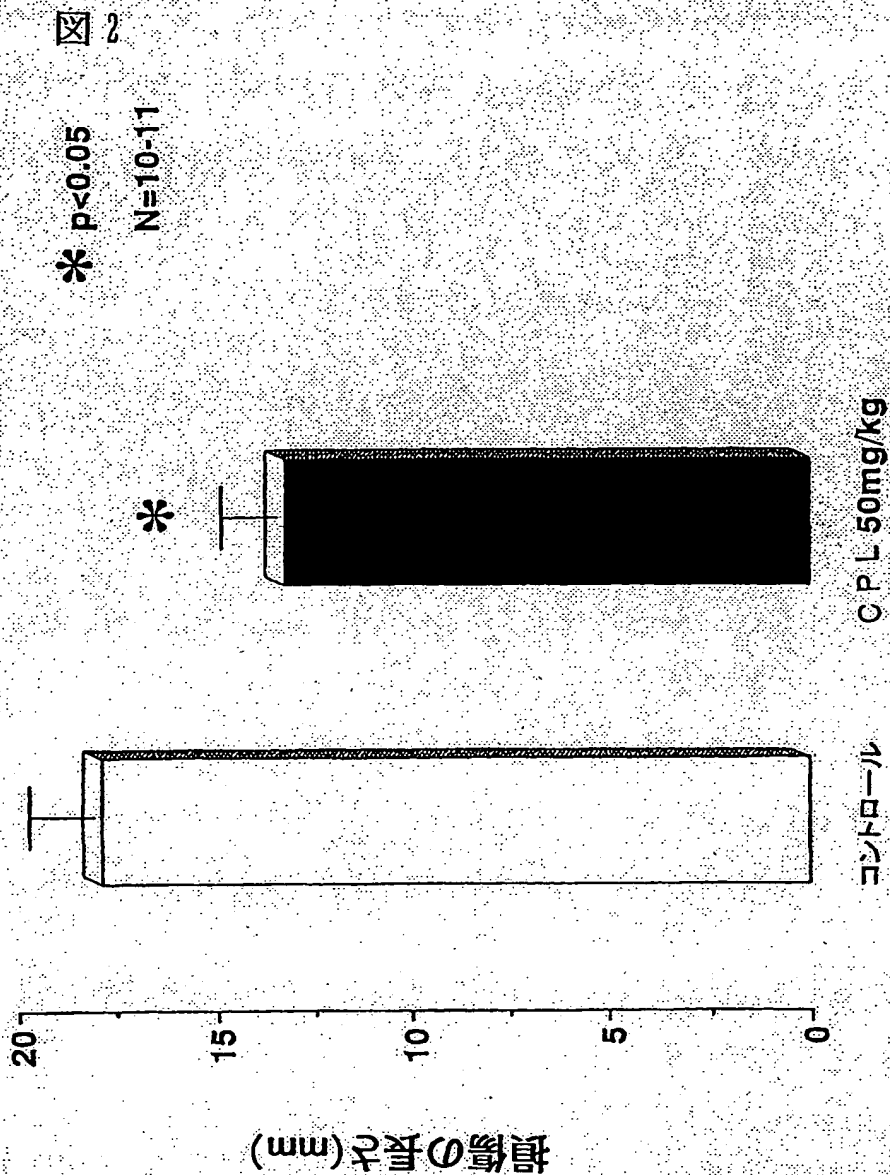


図 3

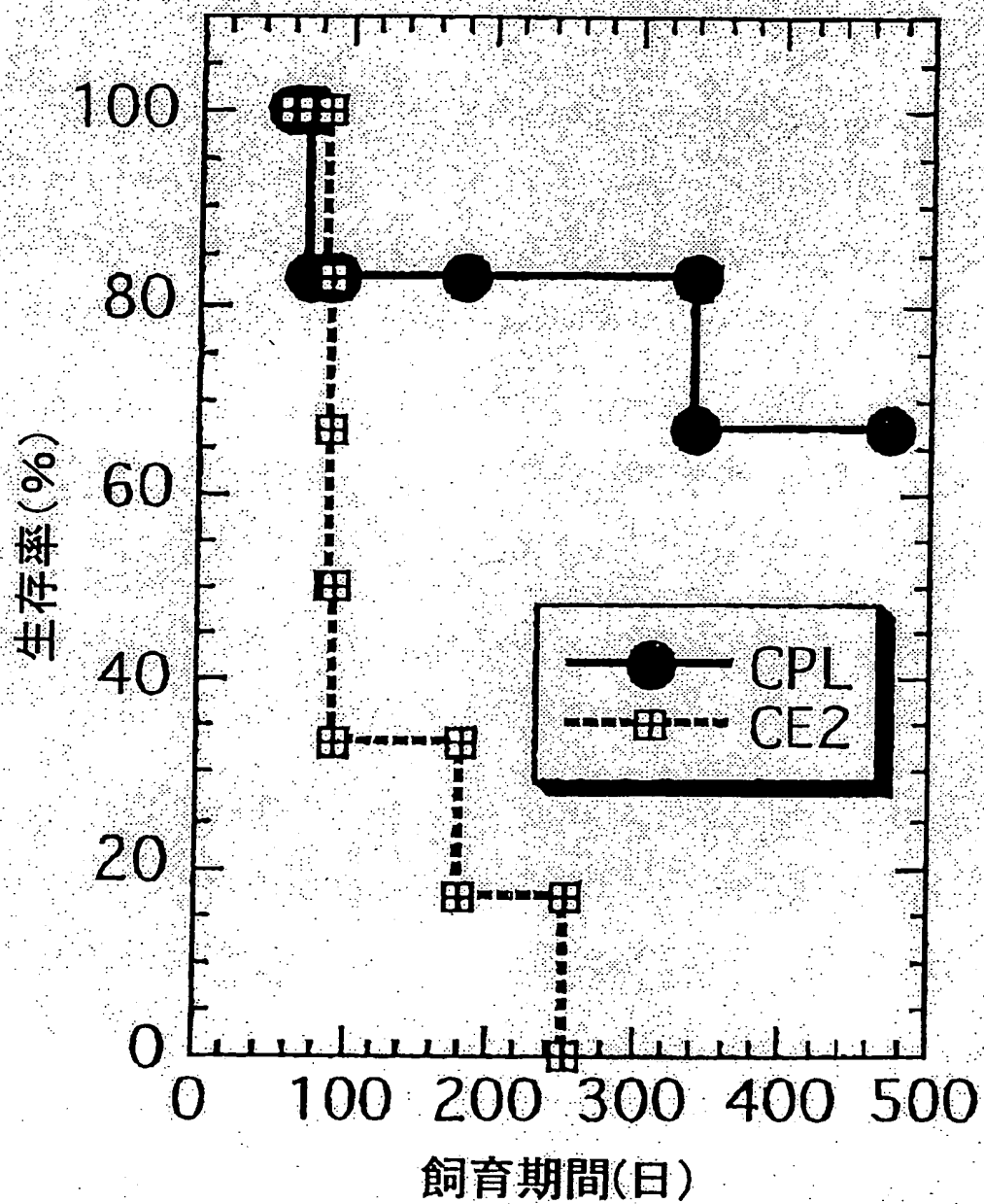
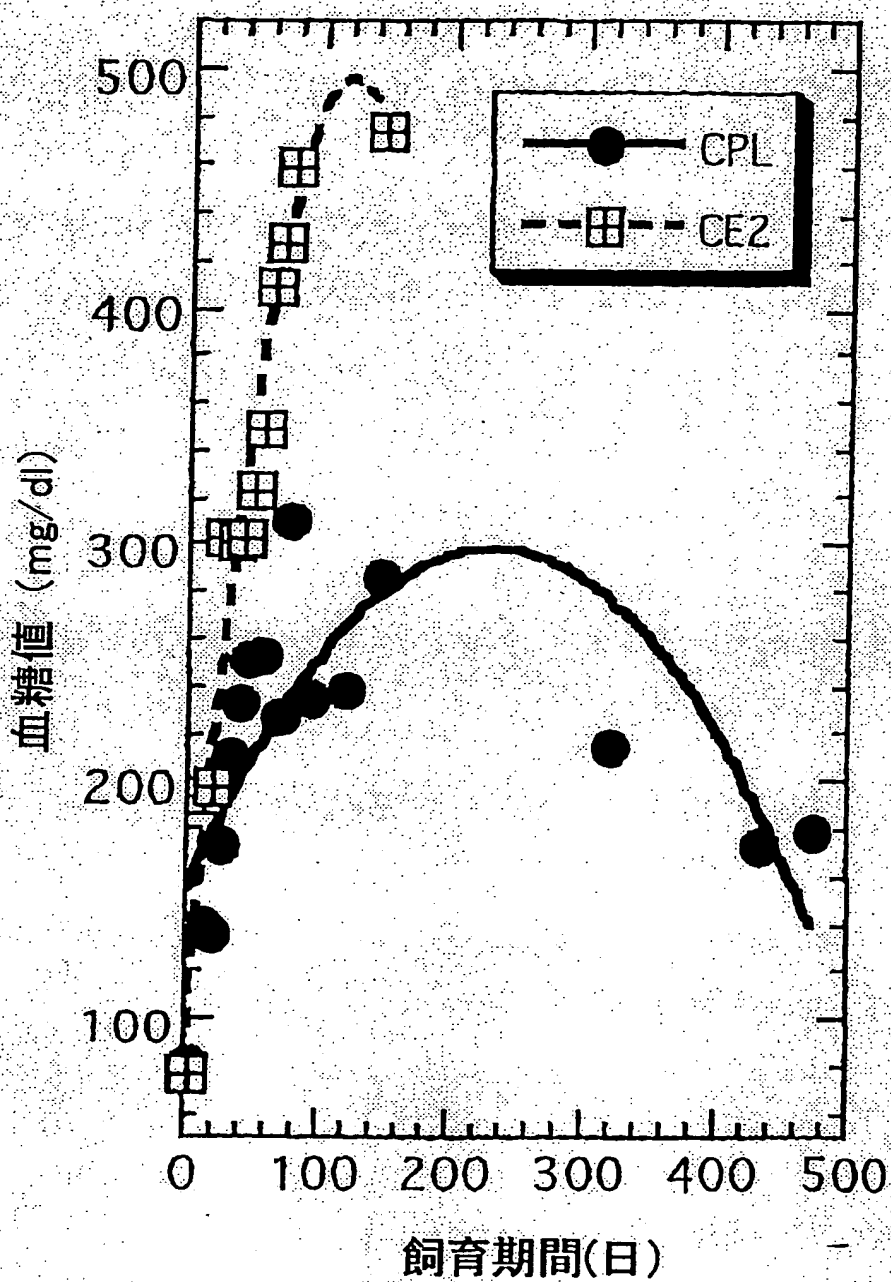


図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00411

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/765, A61P43/00, 1/04, 35/00, A23L1/30//C08G63/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/765, A61P43/00, 1/04, 35/00, A23L1/30//C08G63/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLIN (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yoshio IMANISHI et al., "Nanchisei Shikkan ni Rikan sita Kanja eno CPL Toyo to Men'ekino tono Kanrensei", Medicine and Biology, 1998nen, Vol.137, No.1, pages 15 to 19; particularly, pages 15, 19, lines 6 to 11 & Chem.abstr., 1998, Vol.129 (Columbus, OH, USA), the abstract No.325867	1-10
Y	JP 10-130153 A (K.K. Shumeido), 19 May, 1998 (19.05.98), Abstract; claims; Par. No. [0038] (Family: none)	1-10
Y	JP 9-227388 A (Tetsuaki OSANUSHI), 02 September, 1997 (02.09.97), Abstract; claims; Par. No. [0039] (Family: none)	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
12 April, 2002 (12.04.02)

Date of mailing of the international search report
23 April, 2002 (23.04.02)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00411

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-086526 A (Lotte Co., Ltd.), 28 March, 2000 (28.03.00), Abstract; claims; Par. No. [0005] (Family: none)	1-10
Y	JP 9-132533 A (K.K. Kano Shojuan), 20 May, 1997 (20.05.97), Abstract; claims; Par. Nos. [0007] to [0010], [0015], [0046] (Family: none)	1-10
Y	Toshiaki TAKANO, "Calpis Sannyu no Seiri Kino to Oyo", The Food Industry, 1996nen, Vol.39, No.6, pages 48 to 52; particularly, page 48, left column, line 1 to right column, line 7; page 49, right column, line 10 to page 51, left column, line 13; page 51, right column, line 32 to page 52, left column, line 15 & Chem.abstr., 1996, Vol.125 (Columbus, OH, USA), the abstract No.8824	1-10
Y	JP 10-203994 A (Ichimaru Pharcos Co., Ltd.), 04 August, 1998 (04.08.98), Abstract; claims (Family: none)	1-10
Y	WO 88/07367 A2 (Chellena (Cell Engineering) A.G.), 06 October, 1988 (06.10.88), Abstract & WO 88/07367 A3 & EP 311651 A1 & AU 8814947 A1	1-10
Y	JP 9-227400 A (Pola Chemical Industries Inc.), 02 September, 1997 (02.09.97), Abstract; claims; Par. Nos. [0005] to [0006], [0011] (Family: none)	1-10
X	JP 7-233061 A (Global Art K.K.), 05 September, 1995 (05.09.95), Abstract; claims; Par. No. [0018] (Family: none)	4, 6-9
X	JP 6-336427 A (Global Art K.K.), 06 December, 1994 (06.12.94), Abstract; claims; Par. No. [0040] (Family: none)	4, 6-9
X	JP 5-310581 A (Koken K.K.), 22 November, 1993 (22.11.93) Abstract; claims; Par. No. [0040] (Family: none)	4, 6-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00411

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	JP 2001-139476 A (Amato Pharmaceutical Products Ltd.), 22 May, 2001 (22.05.01), Abstract; claims; Par. No. [0014] & EP 1103263 A2 & CN 1296818 A	4, 6-9
P,X	WO 01/54705 A1 (Amato Pharmaceutical Products Ltd.), 02 August, 2001 (02.08.01) Abstract; claims (Family: none)	4, 6-9
X	Yasukazu NAGATO et al., "Kenkiteki Kaitokei Yokusei Busshitsu, Kanjo Poly Nyusan (CPL) no Koshuyo Sayo (Dai 1 Po) Keiko Toyo ni yoru Mouse Hatsugan Yokusei no Kento", Journal of traditional medicines, 1998nen, Vol.15, No.5, pages 338 to 339; particularly, page 338, left column, line 15 to right column, line 6	4, 6-9
X	Shigeo TAKADA et al., "Ruisu Kokeigan no Zoshoku oyobi Hai eno Ten'i ni Oyobosu Kanjo Poly Nyusan no Koka no Kento", The Journal of Japan Society for Cancer Therapy, 1998 nen, Vol.33, No.3, page 196(222), GP257	4, 6-9
X	Yasukazu NAGATO et al., "Kanjo Poly Nyusan (CPL) Toyo ni yoru Mouse Shizen Haseigan no Hatsugan Koka no Kento", The Journal of Japan Society for Cancer Therapy, 1998nen, Vol.33, No.3, page 196(222), GP258	4, 6-9
X	Yoichiro OSANUSHI et al., "Usagi Kanzo ni Ishoku shita VX2 Gan ni taisuru Kanjo Poly Nyusan (CPL) no Koka", Medicine and Biology, 1997nen, Vol.135, No.5, pages 235 to 239; particularly, full text	4, 6-9
X	Shigeo TAKADA et al., Effect of Cyclic Poly lactate on Tumor Cells and Tumor Bearing Mice., Biochemistry and Molecular Biology International, 1997, Vol.43, No.1, pages 9 to 17; particularly, full text	4, 6-9
X	Shigeo TAKADA et al., "Baiyo Hito Gan Saibo ni oyobosu Kanjo Poly Nyusan no Koka", Medicine and Biology, 1997nen, Vol.135, No.3, pages 89 to 92; particularly, full text	4, 6-9
X	Yoichiro OSANUSHI et al., "Tangan Dobutsu (Yoshida Nikushu Ishoku Rat) ni taisuru Kanjo Poly Nyusan (CPL) Seijo Toyo no Koka", Medicine and Biology, 1997nen, Vol.135, No.1, pages 33 to 36; particularly, full text	4, 6-9
X	Yasukazu NAGATO et al., "Kanjo Poly Nyusan (CPL) no Mouse Fukusui Shuyo Saibo (FM3A Saibo) ni taisuru Koka", Medicine and Biology, 1997 nen, Vol.134, No.2, pages 45 to 48; particularly, full text	4, 6-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/00411

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yasukazu NAGATO et al., "Kanjo Poly Nyusan (CPL) ni yoru Ishoku Shuyo Saibo no Keitai Henka", Medicine and Biology, 1997nen, Vol.134, No.4, pages 135 to 139; particularly, full text	4, 6-9
A	JP 2000-72680 A (K.K. Shumeido), 07 March, 2000 (07.03.00), (Family: none)	1-10
P,A	WO 01/39782 A1 (Amato Pharmaceutical Products Ltd.), 07 June, 2001 (07.06.01), (Family: none)	1-10
P,A	WO 01/21182 A1 (Amato Pharmaceutical Products Ltd.), 29 March, 2001 (29.03.01), (Family: none)	1-10
P,A	WO 01/10451 A1 (Amato Pharmaceutical Products Ltd.), 15 February, 2001 (15.02.01), (Family: none)	1-10

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP02/00411

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/765, A61P43/00, 1/04, 35/00, A23L1/30 // C08G 63/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/765, A61P43/00, 1/04, 35/00, A23L1/30 // C08G 63/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), MEDLIN(STN), EMBASE(STN), BIOSIS(STN), JICST(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	今西 嘉男 等、「難治性疾患に罹患した患者へのCPL投与と免疫能との関連性」、医学と生物学、1998年、第137巻、第1号、第15-19ページ、特に、第15ページ、第19ページ第6-11行 & Chem. abstr., 1998, Vol.129(Columbus, OH, USA), the abstract No.325867	1-10
Y	JP 10-130153 A (株式会社主命堂) 1998.05.19 【要約】、【特許請求の範囲】、【0038】 (ファミリーなし)	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.04.02

国際調査報告の発送日

23.04.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JIP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

滝下 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 9-227388 A (長主 哲明) 1997.09.02 【要約】、【特許請求の範囲】、【0039】 (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2000-086526 A (株式会社ロッテ) 2000.03.28 【要約】、【特許請求の範囲】、【0005】 (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 9-132533 A (株式会社叶匠壽庵) 1997.05.20 【要約】、【特許請求の範囲】、【0007】 - 【0010】、 【0015】、【0046】 (ファミリーなし)	1-10
Y	高野 俊明、「カルピス酸乳の生理機能と応用」、食品工業、1996 年、第39巻、第6号、第48-52ページ、特に、第48ページ左欄第1行- 右欄第7行、第49ページ右欄第10行-第51ページ左欄第13行、第51ペ- ージ右欄第32行-第52ページ左欄第15行 & Chem. abstr., 1996, Vol.125(Columbus, OH, USA), the abstract No.8824	1-10
Y	JP 10-203994 A (一丸ファルコス株式会社) 1998.08.04 【要約】、【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-10
Y	WO 88/07367 A2 (CELLENA (CELL ENGINEERING) A.G.) 1988.10.06 Abstract & WO 88/07367 A3 & EP 311651 A1 & AU 8814947 A1	1-10
Y	JP 9-227400 A (ポーラ化成工業株式会社) 1997.09.02 【要約】、【特許請求の範囲】、【0005】 - 【0006】、 【0011】 (ファミリーなし)	1-10
X	JP 7-233061 A (グローバルアート株式会社) 1995.09.05 【要約】、【特許請求の範囲】、【0018】 (ファミリーなし)	4、6-9
X	JP 6-336427 A (グローバルアート株式会社) 1994.12.06 【要約】、【特許請求の範囲】、【0040】 (ファミリーなし)	4、6-9

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 5-310581 A (興研株式会社) 1993.11.22 【要約】、【特許請求の範囲】、【0040】 (ファミリーなし)	4、6-9
P X	JP 2001-139476 A (天藤製薬株式会社) 2001.05.22 【要約】、【特許請求の範囲】、【0014】 & EP 1103263 A2 & CN 1296818 A	4、6-9
P X	WO 01/54705 A1 (天藤製薬株式会社) 2001.08.02 Abstract, 請求の範囲 (ファミリーなし)	4、6-9
X	長戸 康和 等、「嫌氣的解糖系抑制物質、環状ポリ乳酸 (CPL) の抗腫瘍作用— (第1報) 経口投与によるマウス発癌抑制の検討」、和漢医薬学雑誌、1998年、第15巻、第5号、第338-339ページ、特に、第338ページ左欄第15行-右欄第6行	4、6-9
X	高田 繁生 等、「ルイス固形癌の増殖及び肺への転移に及ぼす環状ポリ乳酸の効果の検討」、日本癌治療学会誌、1998年、第33巻、第3号、196(222)ページ、GP257	4、6-9
X	長戸 康和 等、「環状ポリ乳酸 (CPL) 投与によるマウス自然発生癌の発癌効果の検討」、日本癌治療学会誌、1998年、第33巻、第3号、196(222)ページ、GP258	4、6-9
X	長主 陽一朗 等、「ウサギ肝臓に移植したVX2癌に対する環状ポリ乳酸 (CPL) の効果」、医学と生物学、1997年、第135巻、第5号、第235-239ページ、特に、文献全体	4、6-9
X	TAKADA, Shigeo et al, EFFECT OF CYCLIC POLYLACTATE ON TUMOR CELLS AND TUMOR BEARING MICE., BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, 1997, Vol.43, No.1, pp.9-17, 特に、文献全体	4、6-9
X	高田 繁生 等、「培養ヒト癌細胞に及ぼす環状ポリ乳酸の効果」、医学と生物学、1997年、第135巻、第3号、第89-92ページ、特に、文献全体	4、6-9
X	長主 陽一朗 等、「担癌動物 (吉田肉腫移植ラット) に対する環状ポリ乳酸 (CPL) 静脈投与の効果」、医学と生物学、1997年、第135巻、第1号、第33-36ページ、特に、文献全体	4、6-9

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	長戸 康和 等、「環状ポリ乳酸 (CPL) のマウス腹水腫瘍細胞 (FM3A 細胞) に対する効果」、医学と生物学、1997年、第134巻、第2号、第45-48ページ、特に、文献全体	4、6-9
X	長戸 康和 等、「環状ポリ乳酸 (CPL) による移植腫瘍細胞の形態変化」、医学と生物学、1997年、第134巻、第4号、第135-139ページ、特に、文献全体	4、6-9
A	JP 2000-72680 A (株式会社主命堂) 2000.03.07 (ファミリーなし)	1-10
PA	WO 01/39782 A1 (天藤製薬株式会社) 2001.06.07 (ファミリーなし)	1-10
PA	WO 01/21182 A1 (天藤製薬株式会社) 2001.03.29 (ファミリーなし)	1-10
PA	WO 01/10451 A1 (天藤製薬株式会社) 2001.02.15 (ファミリーなし)	1-10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.